Aus dem Institut für experimentelle Zellforschung der Universität Berlin
Vorstand: Professor Dr. Rhoda Erdmann

Versuche der Züchtung von Nierengewebe in vitro

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Medizinischen Doktorwürde

an der Friedrich-Wilhelms-Universität

zu Berlin

vorgelegt von

Silvio Markees
aus Berlin

Tag der Promotion: 29. Dezember 1933

Jena
Gustav Fischer
1933

111

Aus dem Institut für experimentelle Zellforschung der Universität Berlin
Vorstand: Professor Dr. Rhoda Erdmann

Versuche der Züchtung von Nierengewebe in vitro

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Medizinischen Doktorwürde

an der Friedrich-Wilhelms-Universität

zu Berlin

vorgelegt von

Silvio Markees
aus Berlin

Tag der Promotion: 29. Dezember 1933

Jena
Gustav Fischer
1933

Gedruckt mit Genehmigung
der
Medizinischen Fakultät der Universität Berlin

Dekan: Professor Gocht

Referent: Professor von Bergmann

Abdruck aus dem
„Archiv für experimentelle Zellforschung"
Bd. XIV. 1933
Verlag von Gustav Fischer in Jena

Einleitung.

Die Untersuchungen über das Verhalten von Nierengewebsexplantaten in vitro reichen bis in die Anfänge der Gewebezüchtung. Schon im Jahre 1910 sahen Carrel und Burrows (1) an Nierenkulturen von einer Katze ein sehr aktives Wachstum von Zellen mit verschiedenen Formen. Sie unterscheiden ein Wachstum von Nierenkanälchen vom Rande des Explantats aus und den Austritt spindelförmiger und polygonaler Zellen und Zellverbände. Nach den kurzen Angaben von Hadda (2) und Schamow (3), die beide unter ihren Versuchsbedingungen offenbar nur Bindegewebswachstum beobachten konnten, erschien die noch heute umfangreichste und eingehendste Arbeit über die Niere von Champy (4). Der Verfasser hat mit großem Material an embryonalem jungen und alten Nierengewebe, vorwiegend von Säugetieren, in Serien von Schnitten sehr genaue histologische Untersuchungen, sowohl des Mutterstückes als auch aller auftretenden Auswuchsformen, angestellt. Die Niere erschien ihm als besonders geeignet zum Beweis seiner These von der Dedifferenzierung der Epithelzelle bei ihrer Erhaltung und

Fortzüchtung in der Gewebskultur. Seine Beobachtungen und Schlüsse blieben auch in der Frage der Nierengewebszüchtung nicht unwidersprochen. Im Gegensatz z. B. zu seiner Angabe, die gelegentlich in Nierenkulturen sich bildenden epithelialen Zapfen und Vorbuckelungen seien ohne Lumen und keine echten Nachbildungen von Nierenkanälchen, fanden Drew (5) und ähnlich Rienhoff (6) wirkliche Epithelschläuche mit zentralem Lumen eingebettet in Fibroplastenmassen, denen sie die Rolle zuschrieben, als antagonistisches Gewebe dem Nierengewebe seinen bestimmten Charakter erhalten zu können. Es soll hier nicht versucht werden, die Anschauungen der einzelnen Forscher gegeneinander abzuwägen. Die sich oft in schroffem Widerspruch gegenüberstehenden Befunde lassen sich vielleicht aus den verschiedenartigen Züchtungsmethoden erklären.

Eine spätere genaue Beschreibung der Niere von einem Kaninchenembryo und einem 5 Tage alten Kaninchen liegt von Chlopin (7) in der Reihe seiner Epithelstudien vor. Er setzt sich eingehend mit den Befunden Champys auseinander. Von ihm wurde besonders auf die klare und andauernd erhalten bleibende Trennung epithelialer und bindegeweblicher Elemente in den Kulturen hingewiesen. Das Nierengewebe hat nach ihm eine niemals in der Kultur verloren gehende Spezifität. In weiteren Arbeiten haben Policard (8) und Craciun (9) Abhandlungen über Nierengewebskulturen veröffentlicht. Policards Beobachtungen sind an der Niere einer neugeborenen weißen Ratte gewonnen. Der Autor unterscheidet Fibroplasten, Epithelien und Endothelien und gibt morphologische Unterscheidungsmerkmale der einzelnen Elemente an. Der Theorie Champys folgt er insofern, als er eine Entdifferenzierung der Zellen der Nierenkanälchen bis zu einem gemeinsamen Grundtyp annimmt. Den Unterschied der jeweiligen Formen der ausgewachsenen Zellen begründet er ausschließlich mit den physikalischen Verhältnissen des Mediums. Craciun erwähnt die große Verschiedenartigkeit im Wachstum der einzelnen Kulturen und beobachtet vor allem die ersten Anfänge der Zellaustritte aus dem Mutterstück. Nordmann (10) untersucht an erwachsenen Säugetiernieren die Herkunft bestimmter Zellen bei der Züchtung mit Farbspeicherungsmethoden und betont besonders die begrenzte Gültigkeit der Ergebnisse bei der Epithelzüchtung wegen des Mangels der lebendigen Funktion in vitro. Der Vollständigkeit halber seien noch die neueren Abhandlungen über Nieren-

gewebszüchtung von Nishibe (11) an einer Krötenniere und von Suntzowa (12) an der Froschniere angeführt. Es soll auf den Inhalt der beiden in vielen Punkten sehr gegensätzlichen Arbeiten am Mesonephros der Kaltblütler hier nicht näher eingegangen werden.

Allen aufgeführten Arbeiten ist das eine gemeinsam: Keine von ihnen beschäftigt sich mit dem Nierengewebe unter dem Gesichtspunkt langfristiger Züchtung. In der Erforschung der Epithelien hat nur die Rein- und Dauerkultur einer Epithelart für das Studium ihrer Eigenschaften zum Ziel geführt, wie die Arbeiten über die Schilddrüse von Ebeling (13), sowie die neueste von Demuth (14) und über die Gallenblase von Erdmann (15) oder das Pankreas von Pinkus (16) und später Amoroso (17) und die Leber von Doljanski (18) beweisen. Es lag nahe, das Problem zu untersuchen: Wie verhält sich das Nierenepithel bei langfristiger Züchtung in vitro? Aufgabe dieser Arbeit war also, im Gegensatz zu den schon angestellten, mehr histologischen Untersuchungen, vorwiegend die Bedingungen zu erforschen, wie man die Niere in vitro züchten kann.

Fig. 1. Paraffinschnitt der Niere einer neugeborenen Ratte. Hämotox.-Eosin. Vergr. 110mal. Glomeruli sowie längs- und quergetroffene Kanälchen mit hohem und flachem Epithel.

Züchtungsmethodik und Beobachtungen.

Es wurde zu den Versuchen die Säugetierniere gewählt (Fig. 1), und zwar dienten als Material, um der Entwicklung bis zu endgültiger funktioneller Tätigkeit sicher zu sein, Ratten im Alter von 1—6 Tagen. Hauptsächlich wurden die hilusferneren Gewebsteile benutzt, die Stücke hatten die allgemein übliche Größe.

Die Kulturserien, meist je 20 Einzelkulturen, wurden hauptsächlich auf Glimmer, seltener auf Glas, da der Glimmer für das

Abschneiden weit geeigneter ist, im sitzenden Tropfen gezüchtet. Es kam bei der Züchtung darauf an, die Methode zu finden, nach der irgendeine Epithelart am besten wächst. Bei dem zunächst unternommenen Versuch, die Stücke aus der Spülflüssigkeit — wozu Ringerlösung verwendet wurde — in einen festen Tropfen aus Plasma-Extraktgemisch zu bringen, zeigte sich schon nach 24 Stunden ein fast ausschließliches, sehr üppiges Wachstum von spindelförmigen Zellen. Die Kultur glich dann nach 2—3 Tagen völlig einer jungen Fibroplastenkultur mit ihren typischen, vielgestaltigen Zellen (Fig. 2). Auf die Möglichkeit, daß diese Spindelzellen auch dem in der Niere sehr reichlichen Endothel angehören könnten, sei schon hier hingewiesen. Nach 3—5 Tagen traten an den meisten Kulturen größere oder kleinere Verflüssigungszonen um das Mutterstück herum auf (siehe linker Rand der Fig. 2), in denen freie, dem Blutapparat angehörige Zellen schwammen. Wurden die Kulturen aus dem Tropfen herausgenommen, gewaschen und erneut in festes Medium gesetzt, so wiederholte sich die Bildung des beschriebenen Zellhofes. Eine erneute Verflüssigung blieb in den meisten Fällen aus. Das gleiche geschah bei weiteren Passagen. Ganz selten trat in einer Kultur ein Auswachsen von Schläuchen oder Strängen auf, deren Zellen ihrem Aussehen nach dem Epithel angehörten.

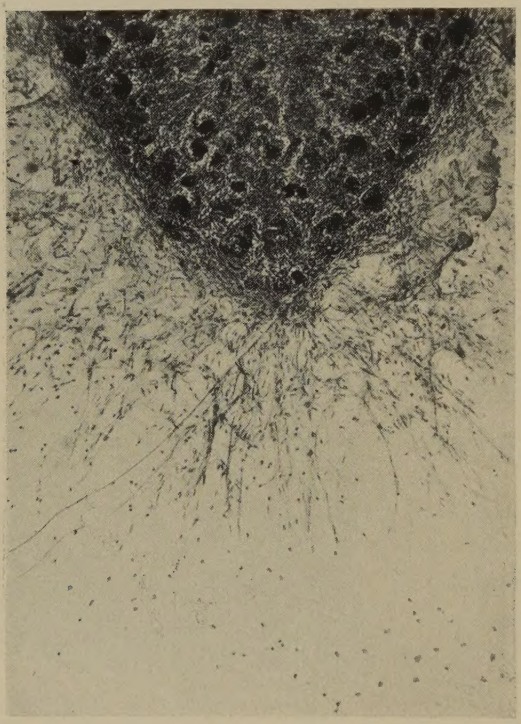

Fig. 2. Nierenkultur von neugeborener Ratte. Totalpräparat 3 Tage alt. Orth. Hämatox.-Delafield. Vergr. 70mal. Züchtung im festen Plasma-Extrakt-Tropfen. Reines Spindelzellwachstum. Deutliche Nierengewebsstruktur des Mutterstückes.

Der weitere Versuch, die Stücke durch direktes Aufsetzen auf den Glimmer zum Epithelwachstum zu bringen, wie mit Erfolg bei anderen Epithelien verfahren wird, mißlang ebenso. Auch dann wuchsen ganz vorwiegend Zellen vom Fibroplastentyp. Als Methode der Wahl ergab sich die Züchtung auf dem festen Tropfen als Unterlage unter einer flüssigen Decke, wie zuerst von Fischer für das Irisepithel angegeben wurde. Dabei muß bei der Niere sehr genau darauf geachtet werden, das Stückchen sehr spät, d. h. nach fast vollständiger Gerinnung des Plasmatropfens, aufzusetzen, einige Minuten zu warten und erst dann die flüssige Decke, einen kleinen Tropfen, aufzupipettieren. Die Gefahr des Abschwimmens ist gering, wenn die Unterlage nicht zu dick ist und wenn man genügend lange nach dem Aufsetzen des Stückes wartet. Setzt man zu früh ein, so daß das Gewebe einsinken kann, so erreicht man wiederum kein Epithelwachstum.

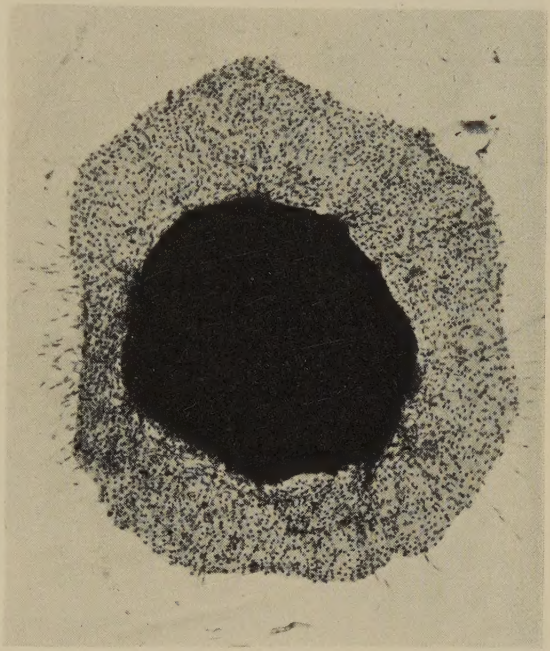

Fig. 3. Rattenniere, 3 Tage alt. Übersichtspräparat I. Passage. Orth. Hämatox.-Delafield. Vergr. 70mal. Membranbildung bei Züchtung im sitzenden Tropfen zwischen fester und flüssiger Phase. Mischwachstum.

Zwischen fester und flüssiger Phase wächst nun aus dem Muttergewebe eine Membran (Fig. 3). Zunächst an einigen Stellen zungenförmig hervorsprossend, umgibt sie meist schon nach 2 bis 3 Tagen, im Laufe mehrerer Passagen immer gleichmäßiger, kreisförmig das Ursprungsstück. Bevor auf das Aussehen, die Struktur der einzelnen Zellen der Membran, sowie auf ihr Verhalten bei der Weiterzüchtung näher eingegangen wird, sei zunächst von der Zusammensetzung des Mediums die Rede. Es fiel gleich zu Beginn

der Versuche auf, daß die Kulturen, deren Tropfen aus Rattenheparinplasma + Hühnerembryonalextrakt verdünnt bestanden, weit schlechteres Wachstum zeigten als die Kontrollkulturen in oder auf Hühnerheparinplasma + Extrakt verdünnt. Die Zellauswüchse waren spärlicher, die einzelnen Zellen sahen wenig lebens- und wachstumsfähig aus. Waren die äußeren Bedingungen dem Wachstum von Membranen günstig, so hoben sich diese sehr häufig blasig vom Mutterstück ab, hatten bald ein zerfetztes Aussehen und zerfielen leicht in Zellhaufen, die im Tropfen herumschwammen. Je länger die Stücke gezüchtet wurden, desto dürftiger wurde das Wachstum, das meist nach der dritten Passage schon gänzlich aufhörte. Diese Beobachtung bestätigte sich bei allen Kulturversuchen: Zusatz von Rattenplasma war für das Wachstum schädlich. Es wurde daher späterhin auf dieses Medium verzichtet und das indifferente Hühnerheparinplasma als Züchtungsgrundlage genommen. Da sich ferner der Hühnerembryonalextrakt dem weit teureren Extrakt von ganz jungen Rattennieren — Rattenembryonalextrakt wurde nicht untersucht — überlegen erwies, wurde er vorwiegend benutzt. Die Züchtungsversuche wurden also zum größten Teil im heterologen Medium ausgeführt.

Fig. 4. Niere von neugeborener Ratte. Totalpräparat 0. Passage 3. Tag. Orth. Hämatox.-Delafield. Vergr. 125mal. Sprossung von blinden Schläuchen neben gewöhnlicher Epithelmembranbildung. Zellgrenzennetz sichtbar.

Betrachtet man die lebende, ungefärbte Membran, so sieht man helle, durchsichtige und sehr flach erscheinende, polyedrische Zellen

verschiedener Größe mit deutlichen Zellgrenzen, untermischt mit länglichen, vielgestaltigen fibroplastenartigen Zellen. Im gefärbten Präparat ist fast durchweg einschichtiges, pflastersteinartiges Wachstum zu erkennen (siehe Fig. 4). An einigen Stellen kann eine Mehrschichtigkeit dadurch vorgetäuscht sein, daß sich die Zellen wie Schuppen teilweise überdecken. Nur an den Ursprungsrändern der Membran liegen manchmal wirklich einige Schichten übereinander. Bei ganz wenigen Präparaten zeigten sich im Anfang Ansätze von tubulösen Gebilden oder kleinen Vorsprüngen,

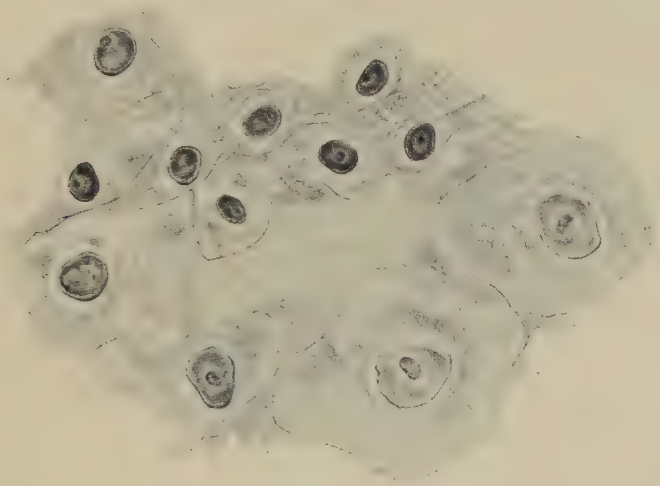

Fig. 5. Rattenniere vom Neugeborenen. Totalpräparat II. Passage. Orth. Hämatox.-Delafield. Vergr. 800mal. Stelle reinen Epithelwachstums. Kleine mittlere und große Epithelzellen mit verschieden stark färbbaren Kernen. Anordnung in Gruppen. Zellgrenzennetz.

die aber niemals sehr weit in die Peripherie vorstießen. Sie waren stets nur im Beginn der Züchtungszeit zu beobachten und hatten das Aussehen isolierter blind endigender Nierenkanälchen (Fig. 4). Es zeigte sich, daß von den Epithelzellen drei Formen das Bild beherrschen: Kleine Zellen mit wenig Protoplasma und ganz dunklem, oft etwas kantigem Kern, etwas größere Zellen mit größerem, stark färbbarem Kern und hellerem Protoplasmaleib und große Zellen mit weitem Protoplasmasaum und einem großen, weit schwächer gefärbten Kernkörper mit 1—3 Nukleolen (Fig. 5). Die Zellen liegen häufig in Gruppen oder Zügen zusammen; ihre quantitative Verteilung ist ganz unregelmäßig.

Schnittpräparate ungezüchteter Rattennieren (s. Fig. 1) zeigen weit ausgeprägter, als dies z. B. bei der Menschenniere der Fall ist, neben den Glomeruluszellen die zwei in ihrer Höhe und Größe sehr verschiedenen Zelltypen der dicken und dünnen Teile der Kanälchen, so daß sich der Schluß aufdrängt, die in der Wachstumszone auftretenden Zellformen seien rein morphologisch am Beginn des Lebens in vitro nach ihrer Zugehörigkeit zum Ursprungsgewebe definierbar. Die Zellen sind flach und sehr zart. Bei unvorsichtiger Behandlung, der kleinsten Zerrung, reißt die Membran ein oder löst sich vom Mutterstück ab. In vielen Präparaten ist schon bei gewöhnlicher Hämatoxylin-Delafieldfärbung das Zellgrenzennetz deutlich sichtbar (s. Fig. 4 u. 5). Es verläuft entsprechend der verschiedenen Größe der Zellen mit sehr unregelmäßigen Konturen. Auf Fig. 5 ist eine Stelle einer Membran wiedergegeben, mit reinem Epithelzellwachstum, während Fig. 6 das sehr häufige Mischwachstum von Epithelzellen und spindelförmigen Zellelementen wiedergeben soll. Diese spindeligen Zellen, die den fast stets scharflinig verlaufenden Saum des Epithels oft überragen und je nach der Stückauswahl und den physikalischen Bedingungen mehr oder weniger zahlreich sind, kommen entweder aus Strängen fibroplastenartiger Prägung, die die Kultur durchsetzen, oder liegen ober- und unterhalb der Epithelmembran. Morphologisch klare Übergänge von Epithelzellen in Spindelzellen ließen sich in keinem Präparat nachweisen! Bei der Absicht, unter den Spindelzellen in einer Mischkultur eine bestimmte Unterscheidung zu treffen zwischen Fibroplasten und Endothelien, kommt man in große Verlegenheit. Es läge an sich nahe, bei dem Gefäßreichtum und der relativen Armut an Bindegewebe in der

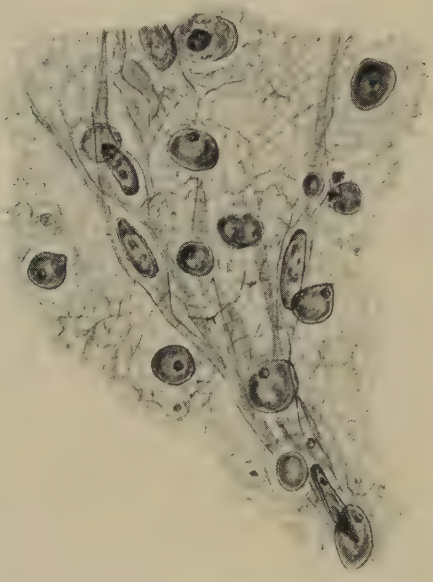

Fig. 6. 2 Tage alte Rattenniere. Totalpräparat III. Passage. Orth. Hämatox.-Delafield. Vergr. 800mal. Mischwachstum von Epithelzellen mit Spindelzellen. Klare Abgrenzung der Zellarten gegeneinander.

Niere anzunehmen, daß sich an dem Spindelzellwachstum das Endothel vorwiegend beteiligt. Sicher lassen sich unter den Zellen rein äußerliche Unterschiede wie Kernform, Nukleolenzahl, flächenhaftere oder schmälere Zellformen, mehr oder weniger deutlich herausfinden. Eine wirklich gültige Folgerung daraus zu ziehen, erschiene zu gewagt.

Nachdem überhaupt Wachstum von Epithel aus der Rattenniere erreicht war, blieb als Hauptaufgabe die Weiterzüchtung zur Dauer- und Reinkultur. Schon an den zuerst auftretenden Membranen konnte man beobachten, daß bereits nach 3—4 Tagen die Zellen im durchfallenden Licht bei starker Abblendung eigentümlich bräunlich aussahen und vakuolig wurden. Ließ man die Kulturen länger als 5 Tage liegen, so begannen die Membranen zu zerfallen, die Zellen verloren den Zusammenhang untereinander und Zelltrümmer schwammen in der flüssigen Schicht. Manchmal trat dies schon am vierten Tag ein. Waschen und Wechsel der flüssigen Schicht hielten den Zerfallsprozeß nicht wesentlich auf. Das Umbetten war also nach 3—4 Tagen unbedingt erforderlich. Es wurde nun, wenn die Kulturen und ihre Zellhöfe noch lebensfrisch aussahen, die flüssige Phase mit der Kapillarpipette abgesaugt, die Membran etwas einwärts vom Rand vier- oder mehreckig abgeschnitten, das Stück vorsichtig mit dem Epithelmesser herausgehoben, nicht zu lange in Ringer gebracht, neu auf den Tropfen gesetzt und mit etwas Embryonalextrakt überschichtet. Fast regel-

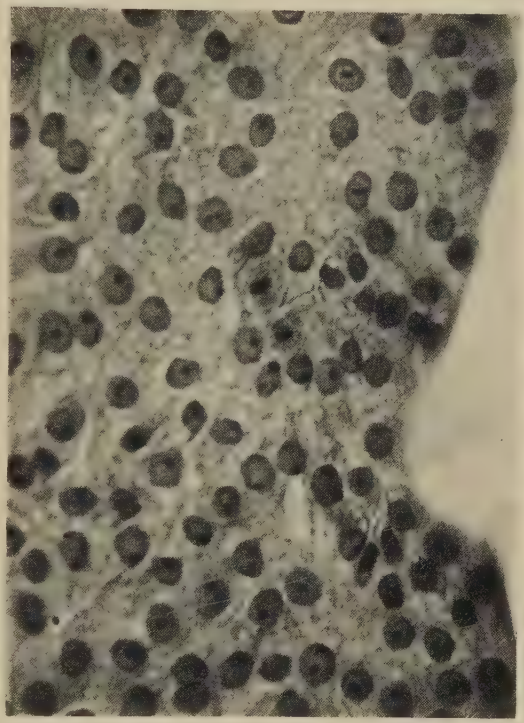

Fig. 7. Kultur von 1 Tag alter Rattenniere nach VI. Passage. Orth. Hämatox.-Delafield. Vergr. 500mal. Rand einer Epithelmembran. Vereinheitlichung von Zellform und -größe. Mitose.

mäßig sah das Bild nach 2 Tagen so aus: Von der alten Membran waren nur noch ausgefranste Reste zu sehen, kleine Zelltrümmer schwammen im Tropfen, oder auch jede Spur eines früheren Auswachsens war verschwunden. Dafür hatte sich eine neue Membran gebildet, die im lebenden Zustand von der ersten wenig verschieden aussah. Dieser Vorgang wiederholte sich nun bei den folgenden Passagen völlig gleichartig. Es gelang, Kulturen bis zu achtmaligem Umsetzen, also etwa einen Monat lang, fortzuführen. Immer wieder bildeten sich neue Membranen, die nach der Herausnahme und dem Neueinsetzen des Stückes der Degeneration anheimfielen. Einige wenige Male waren resistentere Membranen zu beobachten. Die Kulturen zeigten dann nach dem Umbetten am 2.—3. Tag das Wachstum zweier Schichten, jedoch ohne daß diese Zellverbindungen untereinander eingingen. Meist verlief das Wachstum in verschiedenen Ebenen. Im Laufe der Weiterzüchtung zerfielen dann die alten Zellhöfe auch wieder.

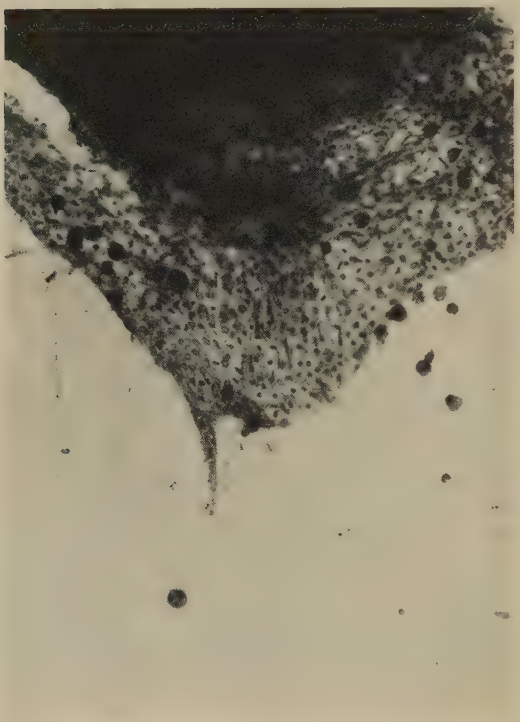

Fig. 8. Rattennierenkultur nach der VII. Passage. Totalpräparat. Orth. Hämatox.-Delafield. Vergr. 120mal. Auftreten von Riesenzellen (Histiozyten?).

Im gefärbten Präparat zeigten die Membranen mit zunehmender Passagenzahl ein etwas verändertes Aussehen (Fig. 7). Die Unterschiede in den Zellgrößen waren nicht mehr so deutlich. Die Zellformen glichen sich einander an. Das Wachstum an spindeligen Zellen wurde, wenn wirklich einige Passagen hintereinander auf dem Tropfen gezüchtet wurden, spärlicher, das Epithel machte einen gereinigteren Eindruck. Präparate, die ganz frei von spindeligen Elementen waren, kamen nicht vor, und hatte es einmal in

ungefärbtem Zustande den Anschein, es handelte sich um eine Reinkultur, so war oft nach dem nächsten Umsetzen an irgendeiner Stelle erneutes Mischwachstum zu beobachten. Bei der Färbung des lebenden Präparates mit Neutralrot und Janusgrün zeigten sich die Granula genau wie die Mitochondrien in reicher Zahl nur an den Rändern der Auswüchse, während sie gegen das Mutterstück zu sehr viel geringer waren. Präparate vom 4.—5. Tag wiesen, mit Sudan gefärbt, stärkere Verfettung auf, ebenfalls hauptsächlich im Randgebiet. Häufig war fast die ganze Zelle bis auf den Kern mit Fett ausgefüllt.

Daß man überhaupt berechtigt ist, von echtem Wachstum zu sprechen, beweisen die fast in allen Passagen beobachteten Mitosen (s. Fig. 7), die sowohl in der Rand- wie auch in der Ursprungszone — hier wohl etwas häufiger — gefunden worden sind. Die Auswanderung des Epithels dürfte nur am Anfang des Lebens in vitro eine gewisse Rolle spielen.

Eine merkwürdige Beobachtung wurde bei einer Kulturserie gemacht: Es traten nach der 7. Passage in einigen Präparaten plötzlich mehrere ganz große runde Zellen auf (Fig. 8), die bis zu drei Kernen enthielten und mit Giemsa dunkelblaue Protoplasmafärbung und rotviolette Kernfarbe annahmen. Blieben die Kulturen einige Tage liegen, so streckten die Zellen Fortsätze aus und glichen dann ganz Makrophagen, die sich in Fibroplasten umwandeln. Auf die Möglichkeit, daß es sich hierbei um Histiozyten handelt, die eine doppelte Umwandlung durchmachen, sei hingewiesen. Jedenfalls sind diese Riesenzellen nicht identisch mit den bei einigen Kulturen schon zu Anfang auftretenden großen polymorphen Zellen, die mit Chlopin (19) als isolierte Epithelzellen betrachtet werden können.

Da sich also bei längerer Züchtungsdauer eine Selbstreinigung der Epithelkultur, wie sie etwa bei der Schilddrüse vorkommt, nicht vollzog, wurde nach dem Vorbild von Doljanski bei Leberkulturen inaktivierter Extrakt (bei 70° $^1/_2$ Stunde) benutzt, um das Wachstum der Spindelzellen zurückzudrängen. Die Membranen zeigten bei unverminderter Wachstumsintensität kein elektives Epithelwachstum, sondern es bildeten sich nach wie vor Mischauswüchse. Die Methode versagt bei der Niere. Alle sonstigen Veränderungen der Züchtungsbedingungen, wie Zumischung von Rattennierenextrakt in wechselnden Verhältnissen, Änderung der Extraktkonzentrationen, Verwendung von Rattenserumzusätzen, hatten keine sichtbare fördernde Wirkung auf Wachstum und Aussehen der Kultur, waren im Gegenteil meist wachstumshemmend.

Mit der Zahl der Passagen flacht sich das Mutterstück ab und wird deutlich kleiner, schließlich so klein, daß das Wachstum aufhört. Auch Abkugelungen des Ursprungsgewebes kommen vor. Es ist ja durchaus begreiflich, daß solche Veränderungen auftreten müssen, wenn die ausgewachsene Membran immer wieder zerfällt und neugebildet wird. Das Mutterstück wird regelrecht „aufgezehrt". Der Versuch, die einmal gebildete Membran zu erhalten und zum Weiterwachsen zu bringen, wurde also zum Kernproblem.

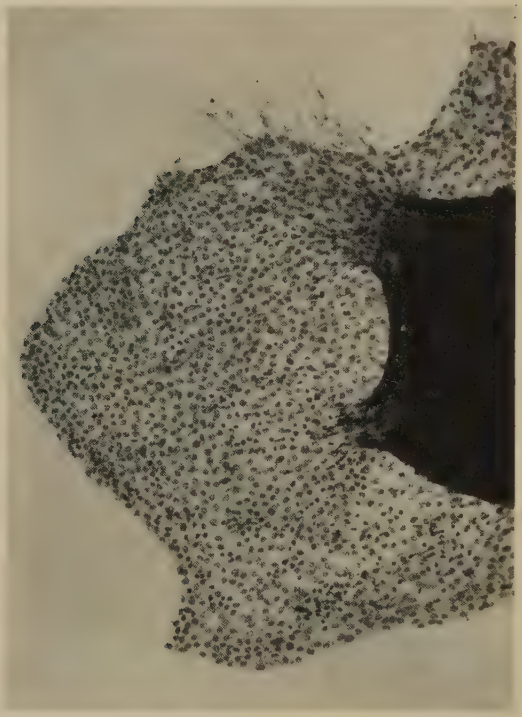

Fig. 9. Neugeborene Ratte, Niere. Totalpräparat III. Passage. Orth. Hämatox.-Delafield. Vergr. 90mal. Kultur nach Absaugung der flüssigen Phase und Einbettung zwischen feste Plasmaschichten. Epithelsaum scharf erhalten. Aussprossen spindeliger Zellen vom Mutterstück aus ober- und unterhalb der Epithelmembran.

Isoliert man ein Stück einer Membran, das seiner absoluten Größe nach durchaus lebensfähig sein könnte, dadurch, daß man das übrige Gewebe wegschneidet, wäscht man und deckt fest oder flüssig wieder ein, so scheint am nächsten Tage eine gewisse Hoffnung berechtigt, das Stück am Leben zu erhalten. Man sieht dünne Wachstumsansätze, die Zellen bleiben im Zusammenhang und sehen frisch aus. Doch meist schon 24 Stunden später beginnt völlige Auflösung und das Epithel geht zugrunde.

Der beim Pankreas erfolgreiche Versuch der Herausnahme des Mutterstückes aus dem Wachstumsring, von dem aus die entstehende Lücke wieder zuwächst und ein neues Mittelstück gebildet wird, wurde bei der Niere wiederholt angestellt. Bei Kulturen, die eine möglichst regelmäßige, kreisförmige Membran aufwiesen,

wurde nach Absaugen der flüssigen Phase sehr vorsichtig mit dem Epithelmesser das Mutterstück herausgelöst, der zurückbleibende Umwachsungsring gewaschen und bald fest, bald flüssig neuüberschichtet. Die Herausnahme ist nicht schwierig, da sich die dünne Epithelmembran sehr leicht vom Ursprungsgewebe trennt. Auch diese Methode führte nicht zum Erfolg. Zwar bildeten sich zunächst zentralwärts gerichtete, dünne Zellfortsätze und Zellbrücken, aber die Wachstums- und namentlich die Verdichtungstendenz zu einem neuen Mutterstück blieb völlig aus. An eine Umpflanzung war wegen der Zartheit und Einschichtigkeit des Gewebes nicht zu denken — es kam stets zu Zelltod und Degeneration.

Ein weiterer Versuch, dem gebildeten Epithel einen gewissen Halt dadurch zu geben, daß nach 2–3tägigem Wachstum die flüssige Schicht abgesaugt und durch einen kleinen Tropfen von festem Plasmagemisch ersetzt wurde, schlug auch fehl. Es wurden dazu Kulturen benutzt, bei denen in ungefärbtem Zustand ein Spindelzellwachstum nicht zu sehen war. Das Epithelwachstum hört wie mit einem Schlage auf, und man kann das Herauswachsen von zahlreichen spindeligen Zellen vom Mutterstück aus verfolgen, die die Kultur strahlenförmig umgeben (Fig. 9).

Das ausgewachsene Epithel ist also zu zart und dünn, zu wenig resistent gegen Stoffwechselprodukte und zu wachstumspotenzarm, um von seinem Ursprungsstück abgetrennt weiterwachsen zu können, wie es nach Doljanski das Leberepithel trotz seiner Einschichtigkeit vermögen soll, und es ist aus dem gleichen Grunde unfähig, nach Herausnahme des Mutterstückes die Lücke auszufüllen, wie Amoroso es beim Pankreas erreicht hat. Das Nierenepithel zeigt nach den angegebenen Tatsachen zahlreiche Verschiedenheiten von anderen Epithelarten bei der Züchtung in vitro und nimmt in ihrer Reihe eine Stellung ein, die vielleicht ihre Begründung in der Besonderheit der Epithelien rein mesodermaler Abkunft haben könnte, wie sie besonders von Chlopin in seinen Epithelstudien betont wird.

Noch ein zweiter Gesichtspunkt ist der Erörterung wert. Das Nierenepithel ist ein sehr hochdifferenziertes Gewebe, dessen Regenerationskraft nach Schädigungen weit geringer ist als die bei den meisten anderen Epithelorganen. Es sei daran erinnert, wie z. B. bei Entzündungsprozessen in der Niere nach dem Zugrundegehen eines Glomerulus in der Regel auch der Untergang des zugehörigen Tubulus folgt und wie es umgekehrt nach Verödung eines Nierenkanälchenabschnittes sekundär zur Degeneration des ganzen Kanäl-

chens und zur Glomerulusatrophie mit bindegewebiger Umwandlung kommt. Neubildung eines Glomerulus oder Tubulus, so etwa wie bei gewissen Parenchymschädigungen der Leber ein Sprossen neuer Leberkanälchen bis zum völligen Umbau, ist nicht bekannt. Übersteigt die Schädlichkeit die reparativen Kräfte der Niere, so tritt an die Stelle untergegangenen spezifischen Epithels ausschließlich unspezifisches Bindegewebe. Diesen Eigenschaften des Nierengewebes in vivo geht nach den Versuchen der vorliegenden Arbeit sein Verhalten bei der Züchtung in vitro parallel.

Besprechung der gewonnenen Ergebnisse.

Die Versuche ergaben als wesentliches, daß das Nierenepithel sehr entschieden von dem Epithel anderer Organe in seinem Verhalten bei der Züchtung abweicht. Es wächst im festen Plasmatropfen eingeschlossen, zum Unterschied etwa vom Pankreas oder der Schilddrüse, nicht in dichten Strängen oder Schläuchen, sondern es wird in seinem Wachstum in der Regel völlig gehemmt, so daß es nur zur Wucherung von Spindelzellen kommt. Für diese Beobachtung findet sich schon bei Champy eine Parallele, der angibt, diese Wuchsform „en nodules ou en boyaux cellulaires" überhaupt nur bei Züchtung der embryonalen Niere gesehen zu haben. So konnte auch der angestrebte Weg, bei einer Kultur mit scheinbar rein epithelialem Zellwachstum etwa durch Fütterung — Zudecken mit kleinem Tropfen Plasma + Embryonalextrakt nach dem Absaugen der flüssigen Decke und Waschen der Kultur — das Epithel zur Umbildung der Wuchsform zu zwingen, nicht zum Ziele führen. Durch keine der angewandten Methoden gelingt es, die Mischkulturen zu reinigen. Die Isolierung reiner Epithelauswüchse zur getrennten Weiterzüchtung ist wegen der geringen Wachstumspotenz und der fehlenden Verdichtungstendenz nicht erreichbar. Die Möglichkeit, die Zahl der Passagen unter den genannten optimalen Züchtungsbedingungen über die erreichte hinaus zu erhöhen, ist wohl nur Frage längerer Beschäftigung und großer Kulturzahl. Zu dem Enderfolg kommen zu können, daß man mit dieser Methode schließlich doch eine Rein- und Dauerkultur von Nierenepithel erhält, ist recht unwahrscheinlich!

Die Beobachtung, daß das heterologe Medium den Kulturen wenigstens eine gewisse Zeitlang nicht schadet, ist nicht neu. Schon Champy berichtet, daß er einen wesentlichen Unterschied des Wachstums bei homologem und heterologem Medium gerade bei der

Niere nicht feststellen konnte. Das gleiche gibt für andere Gewebe Chlopin an. Seltsam und bisher unerklärlich ist dagegen die schädliche Wirkung des Rattenplasmas auf die Rattenniere.

Die differenzielle Diagnostik, welcher Gewebsart in einer Mischkultur die einzelne Zelle jeweils angehört, stößt auf größte Schwierigkeit. Weder morphologische noch physiologische, eindeutige Unterscheidungsmerkmale sind bei dem heutigen Stand der Zellforschung mit ihrer Methodik in jedem Fall anführbar. Es muß deshalb auf die Entscheidung darüber im einzelnen verzichtet werden, ob es sich bei dem beobachteten Zellwachstum nur um Bindegewebs- und Epithelabkömmlinge handelt, wieweit unter den stets wechselnden physikalischen Bedingungen die Gestalt einer Zellart sich der anderen im Aussehen annähern kann, und ob schließlich nicht ein wesentlicher Anteil der spindelförmigen Zellen Abkömmlinge des Endothels darstellt.

Noch schwieriger ist die Frage zu entscheiden, welchem Epithel bei längerer Züchtung und wiederholter Membranbildung die Auswachsung jeweils entspringt: dem der Glomeruli oder dem der Nierengänge, oder anders, welchen größeren oder kleineren Anteil beide daran nehmen. Denn eine schon bei anderem Epithel beobachtete Uniformierung der epithelialen Zellelemente ist auch bei der Nierenkultur deutlich. Mit fortschreitender Züchtungsdauer bekommt die Membran, zumal an spindelzellfreien Stellen, immer deutlicher das Aussehen einfachen Deckepithels.

Zusammenfassung.

Die Züchtung der Rattenniere vom ganz jungen Tier ist für eine begrenzte Zeitdauer nach der Methode der Epithelzüchtung zwischen festem und flüssigem Medium möglich. Es kommt zu typischer Membranbildung, die keine vollständige Epithelreinkultur darstellt. Die Versuche zur Isolierung des Epithels mittels Abschneidens, der Herausnahme des Mutterstückes oder der Veränderung des Züchtungsmediums führt nicht zum Erfolg. Die Nierenepithelzelle zeigt keine Neigung zur Bildung einer mehrschichtigen Kulturmembran, sehr geringe Widerstandsfähigkeit und schwache Regenerationskraft.

Am Schluß der Arbeit ist es mir ein Bedürfnis, Frau Professor Erdmann für die große Förderung und gütige Hilfe meinen aufrichtigen Dank auszusprechen.

Literatur.

1. Carrel, A., and Burrows, M. T., Cultivation of adult tissues and organs outside the body. J. Amer. Med. Assoc. **55**, 1379 (1910).
2. Hadda, S., Die Kultur lebender Körperzellen. Berl. klin. Wschr. **49**, 11 (1912).
3. Schamow, Zur Frage nach der Kultivierung lebender Gewebe außerhalb des Organismus. Russky Wratsch. **1912**, 2043.
4. Champy, C., Quelques résultats de la méthode de culture des tissus. III. Le rein. Archives de Zool. **55**, 307 (1914).
5. Drews, A. H., On the culture in vitro of some tissues of the adult frog. J. of Path. **17**, 581 (1913).
   — Cultivation of tissues and tumors in vitro. Lancet, April 1923, p. 833.
6. Rienhoff, W., Development and growth of the metanephros of permanent kidney in chick embryos. Bull. Hopkins Hosp. **33**, 392 (1922).
7. Chlopin, N., Über „in-vitro"-Kulturen der embryonalen Gewebe der Säugetiere. Archiv mikrosk. Anat. **96**, 235 (1922).
8. Policard, A., Recherches sur les cultures de tissu rénal des mammifères. Bull. Histol. appl. **2**, 101 (1925).
9. Craciun, E., Observations sur les mouvements des cellules epithéliales en cultures de tissus et sur le rôle du stéréotropisme. C. r. Assoc. Anat. **22** (1927).
10. Nordmann, M., The behaviour of adult mamillian kidney in tissue cultures. Arch. exper. Zellforschg **9**, 54 (1930).
11. Nishibe, M., On the cultivation of kidney tissue from the adult toad. Arch. exper. Zellforschg **7**, 87 (1928).
12. Suntzowa, W., Analyse der Gewebe beim Wachstum der Froschniere in vitro. Arch. exper. Zellforschg **10** (1931).
13. Ebeling, A. H., A pure strain of thyroid cells and its characteristics. J. of exper. Med. **41**, 3 (1925).
14. Demuth, F., Über die Züchtung von Schilddrüsenzellen in vitro. Arch. exper. Zellforschg **13**, 329 (1932).
15. Erdmann, Rh., Epithelstudien. I. Die Züchtung des Gallenblasenepithels. Arch. exper. Zellforschg **11** (1931).
16. Pinkus, H., Untersuchungen über das Verhalten des Hühnerpankreas in der Gewebezüchtung. Arch. exper. Zellforschg **10** (1931).
17. Amoroso, E., Die Züchtung von Epithel des embryonalen Hühnerpankreas. Arch. exper. Zellforschg **12** (1932).
18. Doljanski, L., Sur les cultures pures du foie. Arch. exper. Zellforschg **11** (1931).
19. Chlopin, N., Über in-vitro-Kulturen von Geweben der Säugetiere, mit besonderer Berücksichtigung des Epithels. Virchows Arch. **252** (1924).

Lebenslauf.

Ich, Silvio Markees, bin am 21. Februar 1908 in Berlin-Charlottenburg geboren als Sohn des Carl Markees, ordentlicher Professor an der Staatlichen Hochschule für Musik, und seiner Frau Gabriele, geb. Freiin von Stetten. Die Schulzeit verbrachte ich auf dem Fichte-Gymnasium zu Berlin-Wilmersdorf, wo ich im Herbst 1926 meine Reifeprüfung ablegte. Meine Studiensemester habe ich bis auf das erste klinische Semester, das ich in Innsbruck studierte, in Berlin verlebt, wo ich das Physikum im Frühjahr 1929 und das medizinische Staatsexamen im Sommer 1932 bestand. Meine Approbation erwarb ich am 9. September 1933 in Berlin.

Ich habe mich während meiner Studienzeit sehr viel mit Chemie befaßt und im Nebenstudium die beiden chemischen Verbandsexamina gemacht. Die ersten vier Monate der Medizinalpraktikantenzeit arbeitete ich im Institut für Zellforschung bei Frau Prof. Erdmann, wo die vorliegende Arbeit entstand. Am 1. Januar 1933 ging ich an die II. Medizinische Klinik der Charité, wo ich mich zunächst weiter als Internist auszubilden gedenke.